

FARLIB® LIBIOS CELL

Référence : **KB-CELL**

Cellule électrochimique de dérivation post-colonne au brome des aflatoxines pour une détection de leur fluorescence par HPLC



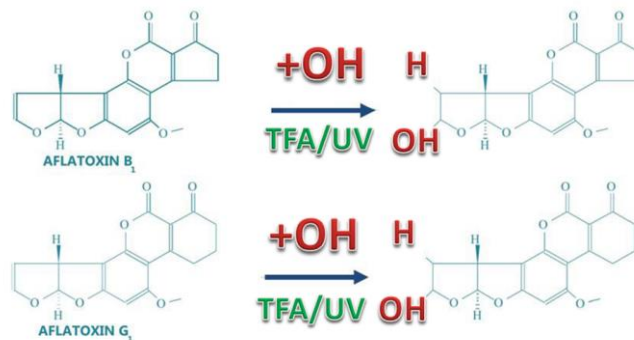
Dynamic Test Kits
for R&D
and Quality Control

Introduction :

La méthode de référence mondiale pour la détermination précise des aflatoxines B1, B2, G1 et G2 dans les variétés de produits alimentaires consiste en une étape de purification sur une colonne d'immunoaffinité suivi par une analyse en chromatographie liquide à haute performance, avec une dérivation post colonne et une détection par fluorescence. Certaines mycotoxines, notamment les aflatoxines B1 et G1, ne fluorescent pas naturellement. Pour surmonter cela, une dérivation avant ou après la colonne est nécessaire. Cette dérivation permet d'accroître leur fluorescence naturelle et de rendre leur détection simple et sensible pour se conformer à la réglementation sur les teneurs maximales autorisées dans les aliments et l'alimentation animale qui sont de plus en plus faibles.

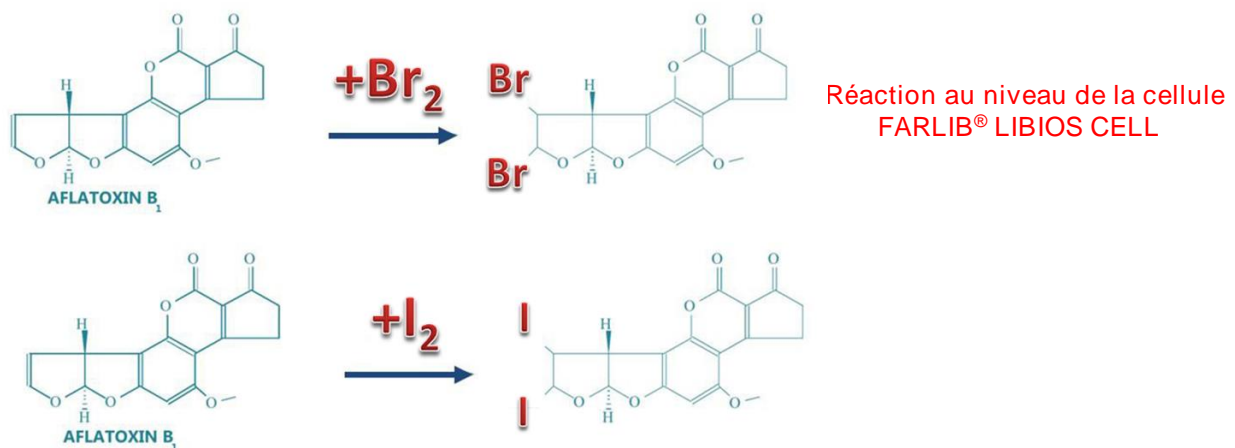
La dérivation des aflatoxines peut être classée en deux groupes : avant ou après la colonne. Cependant la réaction reste similaire. Dans ces réactions, les aflatoxines B1 et G1 sont transformées en aflatoxines B2a et G2a respectivement hydroxylées ou halogénées.

Une dérivation avant la colonne avec l'acide trifluoroacétique (TFA) à 50°C pendant 30 minutes ou bien une dérivation photochimique après la colonne avec un rayonnement UV à 250 nm pendant quelques secondes permettent d'obtenir des dérivés hydroxylés fluorescents des aflatoxines B1 et G1 par l'addition d'une fonction hydroxyle (-OH) au second cycle furanique.



Des dérivés halogénés des aflatoxines B1 et G1 peuvent être obtenus en utilisant soit du brome soit de l'iode et ceci en additionnant un groupe fonctionnel brome (-Br) ou iode (-I) au second cycle furanique des aflatoxines. La formation de dérivés des aflatoxines B1 et G1 hautement fluorescents permettra la détection à de très faibles niveaux de concentration.

Les dérivés bromés des aflatoxines B1 et G1 peuvent être produits soit par une réaction électrochimique (FARLIB® LIBIOS CELL) soit en utilisant le perbromure de bromhydrate de pyridinium (PBPB) à travers une pompe auxiliaire.



Innovations de la cellule FARLIB® LIBIOS CELL :

- Le bloc de la FARLIB® LIBIOS CELL présente une excellente résistance physique et chimique par rapport aux autres cellules disponibles sur le marché qui utilisent un matériau tel que le téflon. Ce bloc conçu en PEEK (polyether ether cétone) présente un rapport résistance/poids plus élevé ainsi qu'une excellente résistance aux produits chimiques, à l'abrasion et à l'hydrolyse.
- Boîtier d'alimentation à basse tension (5V) avec un voyant led d'erreur, ce boîtier fonctionne avec une connexion USB.
- Cellule gravée afin d'éviter toute erreur de manipulation.
- Grille de séparation améliorée de façon à supprimer l'effet d'augmentation de pression et empêcher la casse de la cuve du détecteur de fluorescence.

Avantages :

- Forte augmentation de l'activité fluorescente des aflatoxines et résultats très reproductibles.
- Dérivation en 4 secondes, à température ambiante et sans besoin de bain-marie.
- Agent de dérivation intégré dans la phase mobile : pas de préparation quotidienne nécessaire.
- Phase mobile non modifiée, malgré l'ajout de KBr et d'acide nitrique.
- Pas de manipulation de solutions halogénées (par exemple iode).
- Pas de besoin d'une pompe additionnelle pour l'addition de l'agent de dérivation.
- Pas de problème de corrosion des pompes.
- Faible coûts de maintenance.
- Facile à installer et à désinstaller.

Composants de la cellule FARLIB® LIBIOS CELL :

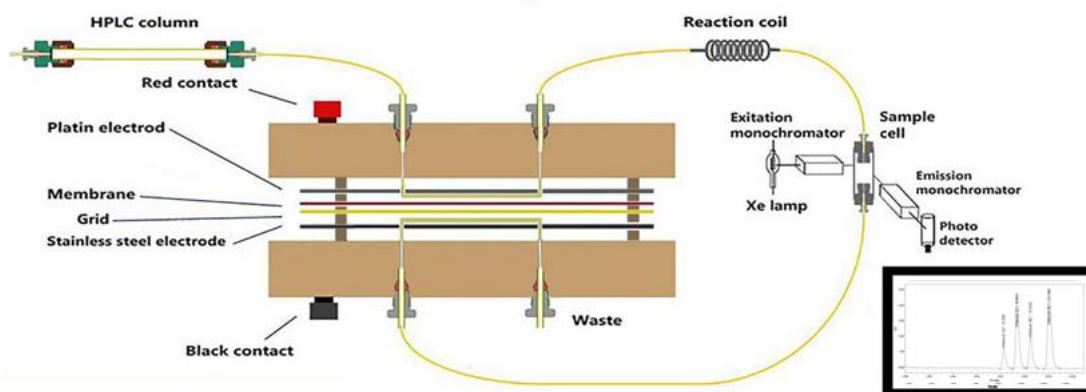
- 1 x Cellule FARLIB® LIBIOS CELL complète avec membrane intégrée
- 1 x Source de courant + câble de connexion
- 1 x Câbles de connexion pour électrodes
- 1 x Membrane de rechange supplémentaire

Notes importantes :

Danger: Les aflatoxines sont des substances dangereuses. Durant l'analyse, utiliser des vêtements de protection et des gants adaptés, des lunettes de protection et une blouse de laboratoire.

- S'assurer que la pression de travail, quand la cellule FARLIB® LIBIOS CELL est connectée, ne dépasse pas les 2 bars sur la cellule du détecteur.
- Conserver la cellule FARLIB® LIBIOS CELL remplie d'eau afin de maintenir la membrane humide lorsque celle-ci n'est pas utilisée.
- Ne jamais nettoyer la cellule FARLIB® LIBIOS CELL avec un solvant organique 100% v/v, ceci endommagerait la membrane.
- Avant de brancher la source de courant, s'assurer toujours que la phase mobile passe bien dans la cellule FARLIB® LIBIOS CELL.
- Avant d'éteindre le système HPLC, débrancher en premier la source de courant de la cellule FARLIB® LIBIOS CELL.
- Utiliser des solvants grade HPLC et maintenir un stock frais de bromure de potassium.
- Ne jamais brancher des connectiques et tubes en métal directement sur la cellule FARLIB® LIBIOS CELL. Cela peut endommager la cellule.
- Utiliser toujours des tubes en plastiques (téflon, peek...) pour les connexions .
- Utiliser toujours le même tube en plastique avec un diamètre intérieur défini.

Installation de la cellule FARLIB® LIBIOS CELL :



- Préparer 1 litre de phase mobile ACN:MeOH:H₂O (200:300:600 v/v/v), contenant 120 mg de bromure de potassium (KBr) et 350 µl d'acide nitrique 4M (HNO₃). Brancher le réservoir de la phase mobile fraîchement préparée au système HPLC.
- Débrancher tous les tubes capillaires de la cellule FARLIB® LIBIOS CELL et connecter la cellule (entrée = emplacement marqué "COLUMN" au niveau de la cellule) à la sortie de la colonne HPLC ayant déjà été connectée à un tube en plastique. Ensuite, brancher la cellule (sortie = emplacement marqué "FLD-in") à l'aide d'un tube en plastique à l'entrée détecteur. La longueur de ce tube est importante et sa longueur est dépendante du débit de l'HPLC et de son diamètre intérieur (D.I.)(se référer à l'équation et table 1 ci-dessous).

$$\text{Equation: } 8.5 * (\text{Débit}) [\text{ml/min}] / (\text{Diamètre Interne})^2 [\text{mm}]$$

Tableau 1

	0.4ml/min	0.5ml/min	0.6ml/min	0.8ml/min	1.0ml/min
0.20mm D.I.	84.9 cm	106.1 cm	127.3 cm	169.8 cm	212.3 cm
0.25mm D.I.	54.3 cm	67.9 cm	81.5 cm	108.6 cm	135.8 cm
0.40mm D.I.	21.2 cm	26.5 cm	31.8 cm	42.4 cm	53.1 cm
0.50mm D.I.	13.6 cm	17.0 cm	20.4 cm	27.2 cm	34.0 cm
0.80mm D.I.	5.3 cm	6.6 cm	8.0 cm	10.6 cm	13.3 cm

- Connecter la sortie détecteur avec tube en plastique à la cellule (entrée = emplacement marqué "FLD-out"). Connecter à l'aide d'un tube en plastique la cellule (sortie = emplacement marqué "waste") vers les déchets. Toutes les connexions doivent être serrées à la main (ATTENTION: Ne jamais serrer fort) et doivent être en plastique.
- Mettre en marche la pompe HPLC.
- Brancher les câbles rouge et noir, à la cellule FARLIB® LIBIOS CELL et à la source du courant (emplacements rouges au câble rouge et emplacements noirs au câble noir). Brancher la source du courant sur un port USB. Mettre en marche la source du courant. La fonction des voyants LED (1 vert et 1 orange) au niveau de la source du courant est indiquée dans le tableau ci-après :

LED		Significations	Actions
OK	Error 1		
on	off	Fonctionnement correct	--
on	on	Cellule non connectée	Vérifier la connexion des câbles rouge et noir à la cellule
		Pas d'additifs dans la phase mobile	Ajouter KBr et HNO ₃ (voir conditions HPLC)

f) Après stabilisation du système HPLC (ligne de base stable, 20-30 minutes), la cellule FARLIB® LIBIOS CELL est prête

Conditions HPLC (proposition) :

Colonne de guard	Optimal guard column ODS-H 1 3 µm - 4.6 mm x 20 mm ou équivalent
Colonne analytique	InertSustain® AQ C18 analytical column ODS1 5 µm - 4.6 mm x 250 mm ou équivalent
Détecteur de Fluorescence	365 nm excitation 435 nm émission
Phase Mobile	Isocratique: ACN:MeOH:H2O 200:300:600. A un litre de phase mobile ajouter 120 mg de bromure de potassium et 350 µL d'acide nitrique 4M. Tous les solvants doivent être de qualité HPLC
Débit	1 ml/min
FARLIB Source de courant	100 µA
Volume d'injection	100 µl
Séquence d'élution	Aflatoxines G ₂ , G ₁ , B ₂ , B ₁

Nettoyage de routine de la cellule FARLIB® LIBIOS CELL :

Si nécessaire, le système HPLC peut être maintenu en fonctionnement toute la nuit et à débit réduit (par exemple 0.1ml/min) avec le détecteur de fluorescence et la cellule FARLIB® LIBIOS CELL toujours branchés. Alternativement, pour une bonne pratique et pour prolonger la durée de vie du système, un nettoyage quotidien est suggéré, comme suit :

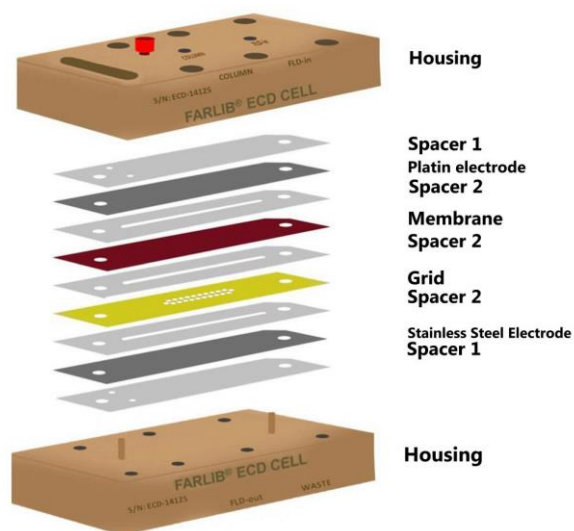
1. Eteindre la source du courant de la cellule FARLIB® LIBIOS CELL et le détecteur de fluorescence.
2. Eteindre la pompe HPLC.
3. Déconnecter le cellule FARLIB® LIBIOS CELL du système HPLC et reconnecter la colonne HPLC directement au détecteur de fluorescence.
4. Pour laver la colonne HPLC, changer la phase mobile en acétonitrile (100% v/v).
5. Démarrer la pompe HPLC et laver le système HPLC durant au moins 30 minutes, puis éteindre le système HPLC.
6. En attendant, grâce à une seringue, pousser manuellement 5-10 ml d'eau distillée à travers la cellule FARLIB® LIBIOS CELL. Puis, stocker la cellule FARLIB® LIBIOS CELL avec de l'eau dedans la cellule, en fermant les trous grâce aux tubes capillaires en plastique. Ceci éviterait le dessèchement de la membrane pendant la période de stockage.

Contrôle de la sensibilité de la cellule FARLIB® LIBIOS CELL :

Il est nécessaire de contrôler régulièrement les performances de la cellule FARLIB® LIBIOS CELL afin de détecter une possible détérioration de la membrane dans la cellule. La sensibilité doit être contrôlée lors de l'installation et toutes les semaines, en comparant les surfaces des pics d'une solution de concentration connue et certifiée de standard d'aflatoxines (par exemple la référence STD-AFBG-250-4 (4ml) ; solution certifiée de mélange d'aflatoxines B1, B2, G1 et G2 à 250ng/ml et par aflatoxine) d'une semaine à l'autre.

Une détérioration peut avoir lieu dans le temps, selon la fréquence d'utilisation et le type d'échantillons analysés. Si les niveaux de sensibilité deviennent inacceptables, la membrane doit être remplacée.

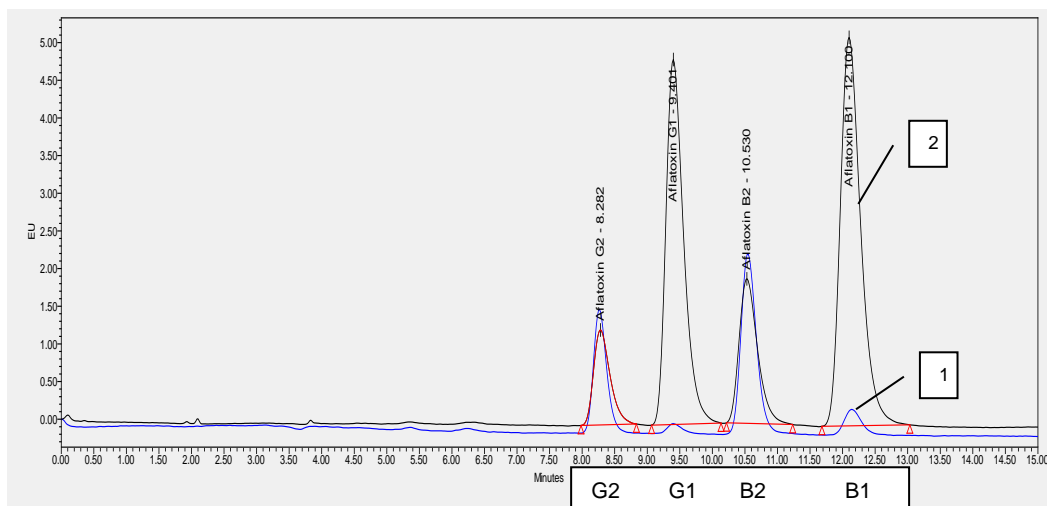
Normalement, dans des conditions d'utilisation intense et extrême, la membrane serait remplacée tous les 6 mois.



Maintenance : Changement de membrane :

- Changer la membrane, lorsque la sensibilité des aflatoxines B1 et G1 baisse et que celle des autres aflatoxines reste la même. Des membranes de rechange sont disponibles séparément (contacter LIBIOS).
- Grâce à une clef hexagonale, dévisser les 6 vis de la cellule.
- Séparer soigneusement le bloc supérieur de la cellule et ensuite retirer les différentes couches. Marquer la position et l'orientation de chaque couche comme elle a été retirée. Continuer à retirer les couches jusqu'à atteindre la membrane de couleur marron.
- Retirer la membrane détériorée et la remplacer par une nouvelle membrane fraîchement retirée de son sachet d'emballage. Eviter de toucher le centre de la membrane avec les doigts de la main. **NE PAS LAISSER SECHER LA MEMBRANE. SI NECESSAIRE, AJOUTER DE L'EAU DISTILLEE.**
- Replacer soigneusement les couches en respectant l'ordre et l'orientation de chacune. Placer le bloc cellule et serrer à la main les 6 vis hexagonales. Ne pas serrer fortement les vis. Maximum 2 Nm.
- A l'aide d'un corps de seringue (sans l'aiguille), faire passer de l'eau déminéralisée dans l'orifice « COLUMN » et s'assurer que l'eau sort bien du côté « FLD-in » sans ayant besoin d'appliquer une quelconque pression.
- A l'aide d'un corps de seringue (sans l'aiguille), faire passer de l'eau déminéralisée dans l'orifice « FLD-out » et s'assurer que l'eau sort bien du côté « Waste » sans ayant besoin d'appliquer une quelconque pression.
- Après changement de la membrane et le branchement de la cellule, s'assurer que la pression de travail, quand la cellule FARLIB® LIBIOS CELL est connectée, ne dépasse pas les 2 bars sur la cellule du détecteur.
- Contrôler régulièrement la sensibilité de la cellule FARLIB® LIBIOS CELL afin de détecter toute détérioration significative de la membrane dans la cellule.

Chromatogramme aflatoxines sans dérivation ("1") versus dérivation avec FARLIB® LIBIOS CELL ("2")



Without explicit permission by LIBIOS SARL, any reproduction or transfer of this document to a third party, the communication of extracts of its contents as well as any external utilisation is not allowed.